

---

**Octrooiraad**



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8901612**

**Nederland**

⑲ **NL**

---

⑤4 **Multivalent meningococcen klasse I buitenmembraaneiwit vaccin.**

⑤1 Int.Cl<sup>8</sup>.: A61K39/095, C07K15/12.

⑦1 Aanvrager: De Staat der Nederlanden, vertegenwoordigd door de Minister van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur te Rijswijk.

⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.  
Nederlandsch Octrooibureau  
Scheveningseweg 82  
2517 KZ 's-Gravenhage.

---

②1 Aanvraag Nr. 8901612.

②2 Ingediend 26 juni 1989.

③2 Voorrang vanaf 19 december 1988, 6 januari 1989.

③3 Land van voorrang: Nederland (NL).

③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 8803111 , 8900036 .

⑥2 - -

---

④3 Ter inzage gelegd 16 juli 1990.

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

---

N.O. 36017

Multivalent meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwit vaccin.

De uitvinding heeft betrekking op vaccins welke gebaseerd zijn op meningococcen buitenmembraaneiwitten. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op vaccins en methoden van produktie gericht op de zgn. klasse 1 meningococcen buitenmembraaneiwitten en daarvan afgeleide peptiden. Genoemde eiwitten resp. peptiden kunnen geproduceerd worden door middel van nieuwe produktiestammen, -methoden, recombinant DNA methoden of peptidesyntheses.

Meningococcen-ziekte wordt vrijwel uitsluitend veroorzaakt door serogroep A,B,C,W-135,Y meningococcen. Ter voorkoming van deze ziekte kan een tetravalent A,C,W-135,Y-polysaccharide vaccin worden toegepast. Dit vaccin bezit de aan polysacchariden inherente immunologische eigenschappen, zoals een slechte immunogeniteit bij jonge kinderen en geen inductie van het immunologisch geheugen bij individuen, die niet eerder met de desbetreffende bacterie in aanraking zijn geweest. Dientengevolge worden de polysaccharide-vaccins slechts bij risicogroepen zoals militairen en reizigers naar gebieden met een hoge incidentie aan meningococcen-ziekte alsook tijdens verheffingen van de ziekte toegepast.

Een groot probleem ten aanzien van de ontwikkeling van een geschikt polysaccharide vaccin tegen meningococcen-ziekte is gelegen in de zeer geringe immunogeniteit van het groep B polysaccharide. Een mogelijke verklaring hiervoor is gelegen in de grote overeenkomst in structuur tussen het meningococcen groep B polysaccharide en humane glycolipiden. Daar groep B meningococcen in vele landen meer dan 50% van de gevallen van meningococcen-ziekte veroorzaken (Poolman et al., 1986, Lancet, Sept. blz. 555-558) biedt de toepassing van het bovengenoemde A,C,W-135,Y polysaccharide-vaccin geen soelaas. Het is nog wel mogelijk de immunogeniteit van het B polysaccharide sterk te verhogen door chemische modificatie, maar hierbij rijst de vraag in hoeverre een dergelijk gemodificeerd groep B polysaccharide na vaccinatie aanleiding zal geven tot ongewenste nevenreacties ten gevolge van een autoimmuun-respons.

De groep A,C,W-135,Y polysaccharide-vaccins zouden sterk aan werkzaamheid toenemen, indien de polysacchariden chemisch gekoppeld werden aan eiwit. Dit zou de toepasbaarheid ervan bij jonge kinderen, de leeftijdsgroep met de meeste gevallen van meningococcen-ziekte, zeer waarschijnlijk maken. Ten aanzien van het groep B polysaccharide zijn meningococcen-eiwitten zelfs mogelijk een uitweg ten aanzien van de toepassing van vaccins ter voorkoming van groep B meningococcen-ziekte.

89016127

Om bovengenoemde redenen is derhalve getracht buitenmembraaneiwwitten van meningococcen tot vaccinkomponent te ontwikkelen, zowel als dragereiwit c.q. additionele vaccinkomponent bij A,C,W-135,Y polysaccharide-vaccins als primair groep B meningococcen-vaccin. Meningococcen bezitten echter vele buitenmembraaneiwwitten, waarvan een tweetal type eiwwitten door Aanvraagster zijn geselecteerd voor vacinontwikkeling: klasse 1 en klasse 2/3 buitenmembraaneiwwitten (Frasch et al., 1985, Rev. Infect. Dis.7: blz. 504-510). Hiervan afgeleide buitenmembraaneiwit-vaccins bevatten gezuiverde klasse 1 en 2/3 buitenmembraaneiwwitten van een stam, waarbij het endotoxine-gehalte tot een zo laag mogelijke waarde is teruggebracht. Dergelijke eerste generatie buitenmembraaneiwit-vaccins zijn door verschillende onderzoekers ontwikkeld en vormen de basis voor een aantal octrooien (EP-A-0 145 359; EP-A-0 109 668; EP-A-0 088 303). Het bezwaar van dergelijke, eerste generatie buitenmembraaneiwit vaccins is gelegen in de stamafhankelijke immuniteit, welke hiermede kan worden opgewekt. Er komen namelijk binnen het species Neisseria meningitidis (meningococcen) meerdere klasse 1 en 2/3 buitenmembraaneiwwitten voor.

Deze uitvinding is gerelateerd aan de wenselijkheid stamafhankelijke immuniteit op te wekken tegen meningococcen zodat een algemene vaccinatie tegen meningococcen-ziekte kan worden uitgevoerd. Het is gebleken, dat vooral het klasse 1 meningococcen buitenmembraaneiwit bactericide, proefdier beschermende immuniteit kan opwekken (Poolman et al., 1987, Ant.v.Leeuwenh. 53: blz. 413-419; Saukkonen et al., 1987, Microb. Pathogen.3: blz. 261-267). Het epidemiologische onderzoek laat echter zien, dat met ongeveer tien monoclonale antistoffen tegen het meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwit vrijwel alle stammen zijn te typeren. (Abdillahi and Poolman, 1988, Microb. Pathogen.4: blz. 27-32). Tevens is gebleken, dat een meningococcen-stam twee onafhankelijke klasse 1 buitenmembraaneiwit specifieke monoclonale antistoffen kan binden. Deze bindingsplaatsen, ook wel epitopen genoemd, zijn beiden doelwit voor bactericide antistoffen, zodat ieder klasse 1 buitenmembraaneiwit twee onafhankelijke aangrijpingspunten, geschikt voor vacinontwikkeling, bevat. Het combineren van vijf of meer klasse 1 buitenmembraaneiwwitten, bevattende tien of meer doelwit-epitopen, tot een vaccin is echter met zuiveringstechnieken niet mogelijk vanwege het neezuiveren van endotoxinen. Tevens worden minder relevante eiwwitten meegezuiverd.

Gevonden werd, dat de bovengenoemde nadelen kunnen worden opgeheven door het op zinvolle wijze verbeteren van de produktiemethoden van meningococcen buitenmembraaneiwit vaccins, toegespitst op het bereiden

89010127

van een multivalent klasse 1 buitenmembraaneiwit vaccin.

De uitvinding heeft betrekking op vaccins, welke gerelateerd zijn aan

- het bereiden van fragmenten van het klasse 1 buitenmembraaneiwit, 5 bijv. door middel van cyanogeen bromide;
- het bereiden van zuivere klasse 1 buitenmembraaneiwitten, uitgaande van mutant stammen, welke het klasse 2/3 buitenmembraaneiwit niet tot expressie brengen;
- het bereiden van zuivere klasse 1 buitenmembraaneiwitten met behulp 10 van gekloneerd DNA in produktievectoren. Dit omvat ook de toepassing van protein-engineering met het doel meerdere epitopen in een DNA leesframe te manipuleren en te produceren; en
- het bereiden van een multivalent klasse 1 buitenmembraaneiwit vaccin door middel van peptide-synthese, aangezien de epitopen met een korte 15 peptideketen synthetisch bereid kunnen worden.

Gebleken is, dat meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwitten een krachtige bactericide immuunrespons opwekken tegen de juiste epitopen bevattende stammen, ongeacht of dit groep A,B,C,W-135,Y meningococcen zijn. Dit impliceert, dat het A,C,W-135,Y polysaccharide-vaccin 20 vervangen kan worden door een vaccin volgens de uitvinding, dat als breedwerkend meningococcen-vaccin toegepast kan worden. De door het klasse 1 buitenmembraaneiwit opgewekte bactericide antistoffen reageren krachtig met afgesplitste fragmenten en korte synthetische peptiden bereid uitgaande van de aminozuurvolgorde van klasse 1 buitenmembran-

25 eiwitten. Gezien het gegeven dat meningococcen-ziekte tegenwoordig hoofdzakelijk door groep B meningococcen wordt veroorzaakt alsook het feit, dat de groep B meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwitten ook bij groep A,C,W-135,Y meningococcen voorkomen, heeft de uitvinding met voordeel betrekking op een vaccin, dat door een of meer fragmenten van

30 groep B meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwitten is gekenmerkt. Bij voorkeur wordt bij de bereiding van een dergelijk vaccin van ten minste tien epitopen uitgegaan, welke geselecteerd zijn op epidemiologische gronden. De vaccins volgens de uitvinding bevatten bijvoorbeeld 10 eiwitten verkregen door zuivering uit mutant stammen, of 10 fragmenten

35 bereid door cyanogeenbromide-fragmentatie, of 10 synthetische peptiden, representatief voor 10 epitopen, of produkten verkregen uit via recombinant DNA technologie verkregen genprodukten bevattende de 10 gewenste epitopen. Voorts kunnen de vaccins volgens de uitvinding met voordeel meningococcen A en C of eventueel W-135 en Y polysacchariden en/of

40 detergentia bevatten. Bij voorkeur worden de A en C polysacchariden

8901612.7

covalent gekoppeld aan de eiwitprodukten. Detergentia kunnen zowel  
 zwitterionogene, kationogene, anionogene en niet-ionogene detergentia  
 zijn. Voorbeelden van dergelijke detergentia zijn Zwittergent 3-10,  
 Zwittergent 3-14 (N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonia-1-propane sulfona-  
 5 te), Tween-20, natrium-desoxycholaat, natriumcholaat en octylglucoside.  
 Tevens kan het vaccin volgens de uitvinding een adsorbent zoals  
 aluminiumhydroxide, calciumfosfaat of met voordeel aluminiumfosfaat  
 bevatten. De fragmenten, eiwitten, peptiden kunnen ook in immunostimu-  
 lerende complexen (Isocoms), liposomen of door middel van andere adju-  
 10 vantia worden verwerkt, zodat grotere immunogeniteit wordt verkregen.

#### BESCHRIJVING RESULTATEN

Typespecifieke monoclonale antistoffen werden bereid tegen ver-  
 schillende meningococcon klasse 1 buitenmembraaneiwwitten. Deze monoclo-  
 15 nale antistoffen omvatten de volgende subtypen: Pl.1, Pl.2, Pl.6, Pl.7,  
 Pl.9, Pl.10, Pl.15, Pl.16, Pl.17. Al deze monoclonale antistoffen  
 reageren met het SDS (sodium dodecyl sulfaat) gedenatureerde eiwit  
 indien getest met Western blotting. Tevens bleek dat een aantal van deze  
 monoclonale antistoffen reageerde met een 25Kd CNBr (cyanogeenbromide)  
 20 fragment van het 42Kd klasse 1 buitenmembraaneiwwit. Dit resultaat impli-  
 ceerde, dat de klasse 1 buitenmembraaneiwwit epitopen hoofdzakelijk van  
 het lineaire type zijn en zodoende met synthetische peptiden zijn na te  
 bootsen. De epidemiologische resultaten van door Aanvraagster uitgevoer-  
 de proeven tonen dat beschreven monoclonale antistoffen het merendeel  
 25 van de groep A,B,C meningococcon kan typeren hetgeen een beperkte  
 heterogeniteit suggereert. Tevens blijkt dat een klasse 1 buitenmem-  
 braaneiwwit twee afzonderlijke typespecifieke epitopen bevat (Abdillahi  
 and Poolman, Microb. Pathogen. 1988, 4: blz. 27-32; idem FEMS Microbiol.  
 Immunol. 47: blz. 139-144).

30 Het gezuiverde klasse 1 buitenmembraaneiwwit, subtype Pl.7,16,  
 afkomstig uit de kweek van een klasse 2/3 vrije mutant bleek in een  
 dosering van 2,5/ug bij muizen een bactericide antistoffenrespons op  
 te wekken van 1:64 serumverduunning. De monoclonale antistoffen tegen  
 meningococcon klasse 1 buitenmembraaneiwwitten, klasse 2/3 buitenmem-  
 35 braaneiwwitten en lipopolysacchariden werden vergeleken op bactericide  
 werking. De monoclonale antistoffen tegen de klasse 1 buitenmembraan-  
 eiwwitten blijken de sterkst bactericide aktiviteit te bezitten (zie  
 Tabel A). De bactericide aktiviteit van deze monoclonale antistoffen  
 blijkt goed te korreleren met de in vivo beschermende aktiviteit, zoals  
 40 gemeten in een rat meningitis model (Saukkonen et al. 1987, Microbiol.

8901012

Pathogen. 3: blz. 261-267). Het Pl.16 epitoom blijkt aanwezig te zijn op het C-terminale CNBr fragment van het klasse 1 buitenmembraaneiwit van stam H44/76 (B: 15: Pl.7,16). Verdere karakterisering van het Pl.16 epitoom is verricht door middel van bepaling van de aminozuurvolgorde van de 17Kd (N-terminaal) en 25 Kd (C-terminaal) CNBr fragmenten. Het C-terminaal 25Kd is verder gefragmenteerd met V8 protease, endoLysC, endoGlu-C en endoArg-C. Met het Pl.16 monoclonale antilichaam positieve fragmenten zijn gesequenced voor zover mogelijk en deze fragmenten zijn vervolgens nagebootst met synthetische peptiden. De bepaalde sequenties zijn als volgt:

N-terminus: DVSLYGEIKAGVEDRNYQLQLTEAQUAANG

N-terminus 25Kd C-terminale CNBr

fragment: (-M) PVSRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKDTNNN

Met V8 protease en endoArg-C fragmentering werden met Pl.16 monoclonale antilichamen reagerende peptiden geïsoleerd met mol.wt. van 7-9Kd en 4-6Kd respectievelijk. De N-terminale sequenties hiervan zijn als volgt:

V8 7-9Kd fragment: FSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKDTN- -RNAFE

Arg-C 4-6Kd fragment: PVSRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTK

Op grond van deze resultaten werden een aantal synthetische peptiden bereid waarvan het volgende peptide een duidelijk positieve reactie met de Pl.16 monoclonale antilichamen vertoont:

EFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKDTNNN

Voor onderzoek naar de exacte chemische identiteit van de omschreven epitopen werd de aminozuurvolgorde vastgesteld als afgeleide van de nucleotide volgorde van de structurele genen van een drietal meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwwitten met verschillende subtypespecifiteit. Vergelijking met een drietal aminozuurvolgorden zal een voorspelling van de exacte epitopen mogelijk maken, hetgeen bevestigd kan worden met behulp van peptide-synthese. De genen werden gekloneerd in lambda gtl1 vector (Barlow et al. (1987), Infect.Immun.55:2743-2740), gesubkloneerd in M13 sequencing vectors en de nucleotidevolgorde werd vastgesteld.

De afgeleide aminozuurvolgorde voor Pl.7,16;Pl.16;Pl.15 eiwwitten is als volgt:

|          | 10  | 20     | 30 | 40    | 50 |
|----------|---|--------|----|-------|----|
| Pl.16    | :DVSLYGEIKAGVEGRNIQAQLTEQPQVTNGVQGNQV--KVTAKSRI | RTKIS  |    |       |    |
|          | *****   | * **** |    | ***** |    |
| Pl.15    | :DVSLYGEIKAGVEGRNFQLQLTEPP-SKSQP---QV--KVTAKSRI | RTKIS  |    |       |    |
|          | *****   | * **** |    | ***** |    |
| Pl.7,16: | DVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASGQVKVTKVTKAKSRI | RTKIS  |    |       |    |

8901012.

60 70 80 90 100 110  
 DFGSFIGFKGSEDLGEGLKAVWQLEQDVS VAGGGASQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVA  
 \*\*\*\*\*  
 DFGSFIGFKGSEDLGEGLKAVWQLEQDVS VAGGGATQWGNRESFVGLAGEFGTLRAGRVA  
 \*\*\*\*\*  
 DFGSFIGFKGSEDLGDLKAVWQLEQDVS VAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVA  
 \*\*\*\*\*

120 130 140 150 160 170  
 NQFDDASQAINPWD SNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPAQNSKS  
 \*\*\*\*\*  
 NQFDDASQAIDPWD SNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPDFSGFSGSVQFVPIQNSKS  
 \*\*\*\*\*  
 NQFDDASQAIDPWD SNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKS  
 \*\*\*\*\*

180 190 200 210 220 230  
 AYKPAYYTKDTNNLTLVPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAF  
 \*\* \*\* \* \*\*\*\*\*  
 AYTPAHYTRQNTDV-FVPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGSYAFKYARHANVGRDAF  
 \*\* \*\* \* \*\*\*\*\*  
 AYTPAYYTKNTNNLTLVPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAF

240 250 260 270 280 290  
 ELFLIGSATSEAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKAKTKNSTT  
 \*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 ELFLIGS-TSEAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKAKTKNSTT  
 \*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 ELFLIGS-GSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGD--KTKNSTT

300 310 320 330 340 350  
 EIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDLIERGKKGENTS YDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAW  
 \*\*\*\*\*  
 EIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDLIERGKKGENTS YDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAW  
 \*\*\*\*\*  
 EIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDLIERGKKGENTS YDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAW  
 \*\*\*\*\*

360 370

LKRNTGIGNYQTINAASVGLRHKE

\*\*\*\*\*

LKRNTGIGNYQTINAASVGLRHKE

\*\*\*\*\*

LKRNTGIGNYQTINAASVGLRHKE

\*\*\*\*\*

Hieruit kan worden afgeleid, dat de volgorde van aminozuren 24-34 en 176-187 sterk verschillend is in de drie eiwitsequenties en naar alle waarschijnlijkheid de twee afzonderlijke epitopen omvatten zoals eerder beschreven op grond van stamtyperingsresultaten. Dit werd bevestigd met behulp van peptidesynthese en reactie van de peptiden met Pl.7, Pl.15 en Pl.16 specifieke monoclonale antistoffen. Van overlappende decapeptiden van het Pl.16 eiwit met het Pl.16 monoclonale antilichaam reageerde alleen het decapeptide YYTKDTNNNL zoals verwacht. In de Pl.7,16 stam is de volgorde YYTKNTNNNL aanwezig, de D-N verandering op plaats 180 heeft weliswaar enig effect op antistofbinding. De volgorde HYTRQNNTDVF in het Pl.15 op dezelfde plaats in het eiwit als de Pl.16 epitop is verantwoordelijk voor binding aan het Pl.15 monoclonale antilichaam. De volgorde van 24-34 van het Pl.7,16 eiwit AQAANGGASG is verantwoordelijk voor binding aan het Pl.7 monoclonale antilichaam. Het is waarschijnlijk, dat de volgorden QPQVINGVQGN en PPSKSPQ in de Pl.16 en Pl.15 eiwitten ook epitopen vertegenwoordigen, maar daar zijn nog geen monoclonale antilichamen tegen ontwikkeld. De twee epitopen van de afzonderlijke eiwitten bevinden zich op zgn. surface loops van deze membraaneiwitten. Dergelijke porine buitenmembraaneiwitten bevatten meer dan twee surface loops. Dit impliceert dat er surface loops zijn welke qua aminozuurvolgorde identiek zijn binnen de verschillende klasse 1 buitenmembraaneiwitten. Dit opent de weg naar het gebruik van gemeenschappelijke peptiden van het klasse 1- buitenmembraaneiwit voor vaccindoeleinden. Meer in het bijzonder wordt in Fig.1 een schematisch twee- dimensionaal model van het meningococcen klasse 1 buitenmembraaneiwit Pl.16 weergegeven. Dit model omvat een achttal surface-loops, waarbij de eerste en de vierde loop de op grond van stamtyperingsresultaten aangetoonde type-specifieke epitopen bevatten.

Een illustratie van de reaktiviteit van het decapeptide YYTKDTNNNL met de Pl.16 monoclonale antistof MN5C11G (Pl.16 specifiek) wordt in het als Fig.2 opgenomen pep-scan weergegeven.

8901012.



Behalve de epitopen voor de Pl.7,16, Pl.16 en Pl.15-eiwitten is de epitoot van het Pl.2-eiwit door Aanvraagster opgehelderd. Deze epitoot, welke zich op de top van loop 4 bevindt, bezit de samenstelling HFVQQTPQSQP.

5 Behalve op vaccins, gebaseerd op de epitopen, welke karakteristiek zijn voor de bovenvermelde typespecifieke klasse 1 buitenmembraan-eiwitten heeft de uitvinding tevens betrekking op vaccins, gebaseerd op eiwitsegmenten aan de oppervlakte van het membraan, welke volledig of nagenoeg volledig "constant" zijn bij de meningococce klasse 1 buiten-  
10 membraaneiwitten. Met behulp van dergelijke, op "constante" peptiden gebaseerde vaccins kan de stamafhankelijkheid op directe wijze worden opgeheven. Onder verwijzing naar de bovenvermelde aminozuurvolgorde van de Pl.7,16-, Pl.16- en Pl.15-eiwitten is bij loop 4 (zie mede Fig.1) zowel het peptide AQNSKSAYKPA - dit peptide gaat vooraf aan het type-  
15 specifieke epitoot YYTKDTNNNL - als het daarop volgende peptide TLVPAVVGKPG (nagenoeg) constant.

Het gebruik van een tiental decapeptiden, bereid via synthese, is geïndiceerd en zeer wel produktietechnisch realiseerbaar. Via recombinanttechnieken kunnen meerdere epitopen gekombineerd worden in een lees-  
20 frame door middel van fusie-eiwit technologie en/of uitwisseling van stukjes DNA binnen een gen.

## 25 BEREIDING VAN EEN MULTIVALENT MENINGOCOCCEN KLASSE 1 BUITENMEMBRAAN-EIWIT VACCIN

De bereiding van een multivalent klasse 1 meningococce buitenmembraaneiwit vaccin kan op een aantal verschillende manieren worden gerealiseerd. Dit wordt hieronder nader toegelicht; deze toelichting dient  
30 niet beperkend te worden uitgelegd.

### METHODE A: Zuivering van klasse 1 buitenmembraaneiwitten uit bacteriologische kweek.

Deze kweek kan worden verricht met de gewenste wilde type stammen, mutant meningococce stammen zonder klasse 2/3 buitenmembraaneiwitten  
35 en/of homologe en heterologe recombinant micro-organismen welke de gewenste meningococce klasse 1 buitenmembraaneiwit epitopen tot expressie brengen via overproducerende vectoren al dan niet via bestaande open reading frames en/of gemanipuleerde leesframes zodat  
40 fusie-eiwitten of eiwitten met verwisselde epitopen kunnen worden

bereid.

Voorbeelden van wilde type stammen zijn:

H44/76(B:15:Pl.7,16) (Holten E, Noorwegen); 187(B:4:Pl.1,7) (Etienne J, Frankrijk); M1080(B:1:Pl.1,7) (Frasch C, USA); Swiss4(B:4:Pl.15)  
 5 (Hirschel B, Zwitserland); B2106(B:4:Pl.2); (Berger U, West Duitsland);  
 395(B:NT:Pl.9) (Jonsdottir K, IJsland); M990(B:6:Pl.6) (Frasch C, USA);  
 2996(B:2b:Pl.2) (collectie van aanvrager); M982(B:9:Pl.9) (Frasch C, USA);  
 S3446(B:14:Pl.6) (Frasch C, USA); H355(B:15:Pl.15) (Holten E, Noorwegen);  
 6557(B:17:Pl.17) (Zollinger W, USA) en B40(A:4:Pl.10)  
 10 (Achtman M, West Duitsland). Een voorbeeld van een klasse 3 negatieve mutant is H44/76III5(B:-:Pl.16) (collectie van aanvrager).

Deze stammen worden van -70°C voorkultures geënt in schudkolven en van daaruit in fermentorkultures van 40, 150 of 350 liter. Het semi-  
 15 synthetische medium bestaat uit: L-glutaminezuur 1,3 g/l, L-cysteine.HCl 0.02 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 10 g/l, KCl 0.09 g/l, NaCl 6 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1,25 g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,6 g/l, glucose 5 g/l, Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 100 µM, gistdialysaat.

Gedurende de kweek in de fermentor werden de pH en pO<sub>2</sub> gecontro-  
 20 leerd en automatisch op een pH van 7,0-7,2 en een luchtverzadiging van 10% geregeld. De cellen werden met behulp van centrifugeren en wassen met steriel 0.1M NaCl geoogst en bij -20°C opgeslagen of gevriesdroogd.

De bacteriemassa wordt bijvoorbeeld geëxtraheerd met behulp van 0.5 M  
 25 CaCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) Zwittergent 3-14 (Zw 3-14) en 0.14 M NaCl, pH 4.0, 100 ml extractievloeistof per gram drooggevroren bacteriemassa. De suspensie wordt gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geroerd en vervolgens gecentrifugeerd (1 uur, 3000xg), waarna het supernatant steriel wordt verzameld. Aan het supernatant wordt 20% ethanol toegevoegd (v/v) en na  
 30 30 min. roeren wordt het produkt gecentrifugeerd (30 min., 10.000xg) waarna het supernatant aseptisch wordt verzameld. Het supernatant wordt vervolgens door middel van diafiltratie in een Amicon Hollow Fiber System (H1D x 50, cut off 50.000) geconcentreerd en ontdaan van CaCl<sub>2</sub> en ethanol. Het concentraat wordt met 0.1M natriumacetaat, 25 mM EDTA,  
 35 0.05% Zw 3-14, pH 6.0 tot het oorspronkelijke volume verdund en daarna opnieuw geconcentreerd door middel van een diafiltratie. Deze procedure wordt vijfmaal herhaald. De pH van het laatste concentraat wordt op een waarde van 4.0 gebracht. Aan het concentraat wordt 20% (v/v) ethanol toegevoegd en na 30 min. roeren wordt het produkt gecentrifugeerd (30  
 40 min., 10.00xg). De hele eiwitten worden gezuiverd met behulp van kolom-

89010127

chromatografie in aanwezigheid van detergens, bijv. Zw 3-14. Veelal wordt zowel gelfiltratie op Sephacryl S-300 als ionenwisseling op DEAE Sepharose toegepast. De gebruikte extractiemethode, detergentia, kolom-chromatografie zijn niet de enige toe te passen methoden, doch gelden  
5 slechts als voorbeelden en dienen niet als beperkend te worden be-schouwd.

#### METHODE B: Fragmentering van eiwitten.

Als eerste methode bij meningococce klasse 1 buitenmembraaneiwit-  
10 ten geldt de cyanogeenbromide-fragmentering. De gezuiverde klasse 1 of mengsels van klasse 1 en 3 buitenmembraaneiwitten worden opgenomen in 70% mierzuur (v/v) en met 10-voudige overmaat CNBr gedurende 16 uren bij kamertemperatuur behandeld. Het CNBr en mierzuur worden via indam-ping verwijderd en vervangen door 0.2 M tris.HCl, 6 M ureum pH 7.2. Het  
15 supernatant wordt door middel van gelfiltratie op Sephacryl S-200 voor-gezuiverd en daarna met behulp van TSK-2000 gelfiltratie via HPLC gezuiverd.

De gezuiverde klasse 1 buitenmembraaneiwitfragmenten kunnen nog verder worden gefragmenteerd met behulp van endoLysC, endoArg-C,  
20 endoGlu-C, V8 protease en andere eiwitsplitsende enzymen. Deze fragmen-ten worden gezuiverd met behulp van HPLC.

De eiwitten en/of fragmenten, gezuiverd volgens methoden A en/of B worden tot vaccin verwerkt m.b.v. meningococce C polysaccharide, deter-gentia, zoals Na-cholaat, Na-desoxycholaat, Tween-20 en andere of door  
25 verwerking in liposomen of immunostimulerende complexen.  $Al_2(PO_4)_3$  kan als adjuvans worden toegevoegd. Voor de kleinere fragmenten is het nodig dat deeltjesvergroting wordt gerealiseerd en dat ervoor wordt gezorgd, dat voldoende T-hulp epitopen in het vaccin aanwezig zijn, wat te realiseren is met behulp van toegevoegde homologe of heterologe  
30 T-hulp epitopen.

#### METHODE C: peptide synthese

De gewenste B-cel epitopen op de verschillende meningococce klasse 1 buitenmembraaneiwitten worden met behulp van vaste fase peptidesynthe-  
35 se bereid en aan elkaar gekoppeld via daartoe geëigende koppelingsmetho-den, zoals thioether, maleimide, succinimidyl e.a. Er wordt voor gezorgd, dat homologe of heterologe T-hulp aanwezig zijn. De peptide vaccins worden immunogeen gemaakt via deeltjesvergroting of door verwer-king in membraandeeltjes.

TABEL A (zie blz. 4)

Bactericide aktiviteit van een kollektie monoclonale antilichamen, gericht tegen het klasse 1 (kl 1), klasse 2/3 (kl 2/3) en lipopolysaccharide (LPS) van meningococcen. (NB = niet bepaald).

| <u>Test stam</u>          | <u>Bactericide aktiviteit van antistofpool (titer)</u> |                  |                 |
|---------------------------|--|------------------|-----------------|
|                           | <u>kl 2/3 pool</u>                                     | <u>kl 1 pool</u> | <u>LPS pool</u> |
| 3006 (B:26:P1.2:L2)       | 1000   | 8000             | NB              |
| M981 (B:4:P1.-:L5)        | 10   | NB               | 2000            |
| M990 (B:6:P1.6:L?)        | 10   | 2000             | NB              |
| M978 (B:8:P1.1:L1,8)      | NB   | 8000             | 1000            |
| M982 (B:9:P1.9:L3,7)      | 500  | 2000             | 1000            |
| H355 (B:15:P1.15:L1,8)    | 1000   | 8000             | 1000            |
| H44/76(B:15:P1.7.16:L3,7) | 1000   | 8000             | 4000            |

## CONCLUSIES

1. Vaccin met een werking tegen meningococce-n ziekte, gekenmerkt door een werkzaam gehalte aan een of meer meningococce-n klasse 1 buiten-  
5 membraanei-witten resp. fragmenten ervan.

2. Vaccin volgens conclusie 1, gekenmerkt door meningococce-n klasse 1 buitenmembraanei-witten, afkomstig uit klasse 2/3 negatieve mutanten resp. fragmenten ervan.

3. Vaccin volgens conclusie 1 of 2, gekenmerkt door klasse 1  
10 meningococce-n buitenmembraanei-witten, afkomstig uit met rDNA technologie gemanipuleerde micro-organismen resp. fragmenten ervan.

4. Vaccin volgens conclusie 2 of 3, gekenmerkt door een of meer klasse 1 meningococce-n buitenmembraanei-witten van groep A,B,C,W-135,Y meningococce-n resp. fragmenten ervan.

15 5. Vaccin volgens conclusie 2 of 3, gekenmerkt door een of meer klasse 1 buitenmembraanei-witten van groep B meningococce-n resp. fragmenten ervan.

6. Vaccin volgens conclusie 5, gekenmerkt door 5-10 verschillende groep B meningococce-n klasse 1 buitenmembraanei-witten resp. fragmenten  
20 ervan.

7. Vaccin volgens conclusie 1, gekenmerkt door eiwitfragmenten verkregen door een cyanogeenbromide behandeling van ei-witten, gedefinieerd in een of meer der conclusies 1-6.

8. Vaccin volgens conclusie 1 of 7, gekenmerkt door fragmenten van  
25 klasse 1 meningococce-n buitenmembraanei-witten, gedefinieerd in een of meer der conclusies 1-7, verkregen door proteolyse, zoals endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C en V8-protease.

9. Vaccin volgens conclusie 1, gekenmerkt door een gehalte aan een of meer door middel van rDNA-technologie resp. peptide-synthese verkregen synthetische peptiden, welke ten minste overeenkomen met een of meer  
30 bactericide antistoffen bindende epitopen van meningococce-n klasse 1 buitenmembraanei-witten.

10. Vaccin volgens conclusie 9, gekenmerkt door een gehalte aan een of meer der synthetische peptiden welke ten minste de samenstelling  
35 QPQVINGVQGN, PPSKSQP, QAANGGASG, YYTKDTNNLTL, YYTKNTNNLTL, YYTKDTNNNL, YYTKNTNNNL, HFVQQTPQSQP en/of HYTRQNNTDVF omvatten.

11. Vaccin volgens conclusie 9 of 10, gekenmerkt door 5-20 B-cel epitopen, aanwezig in de produkten volgens conclusies 1-8, waarbij deze epitopen zich in surface loops van meningococce-n klasse 1 buitenmem-  
40 braanei-witten in het gebied van aminozuren 24-34 en 176-187 bevinden.

12. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1, 7 en 8, gekenmerkt door peptiden in surface loops van klasse 1 meningococce buiten-membraaneiwitten.

13. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1, 7 en 8, gekenmerkt door rDNA produkten, bijv. fusie-eiwitten, welke meerdere in conclusies 9-12 gedefinieerde epitopen bevatten.

14. Vaccin volgens een of meer der conclusies 7-13, gekenmerkt doordat via chemische koppeling homologe of heterologe T-help epitopen zijn toegevoegd.

15. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-14, met het kenmerk, dat het vaccin tevens meningococce A, C, W-135 en/of Y polysacchariden bevat, eventueel in conjugaatvorm met het eiwitprodukt.

16. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-15, met het kenmerk, dat het vaccin tevens een zwitterionogeen, kationogeen, anionogeen en/of niet-ionogeen detergent bevat.

17. Vaccin volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat het detergent is gekozen uit de groep, bestaande uit Zw 3-10, Zw 3-14, Tween-20, natriumcholaat, octylglucoside en natriumdesoxycholaat.

18. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-17, met het kenmerk, dat het vaccin tevens een adsorbent bevat, gekozen uit de groep bestaande uit aluminiumfosfaat, aluminiumhydroxide en calciumfosfaat.

19. Vaccin volgens conclusie 18, met het kenmerk, dat het adsorbent aluminiumfosfaat is.

20. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-15, met het kenmerk, dat adjuvantia zoals immunostimulerende complexen worden toegepast.

21. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-15, met het kenmerk, dat het vaccin in membraandeeltjes, zoals liposomen, wordt verwerkt.

22. Vaccin volgens een of meer der conclusies 1-15, met het kenmerk, dat het vaccin al dan niet covalent, aan lipiden wordt gekoppeld.

\*\*\*

[illegible]

0001012.

fig-2

